

Rec'd PCT/PTO

28 MAR 2005

PCT/JP 03/11935

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

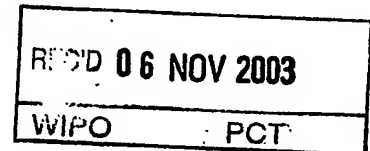
18.09.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 2 年 9 月 3 0 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 2 8 7 4 2 2
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 2 8 7 4 2 2]



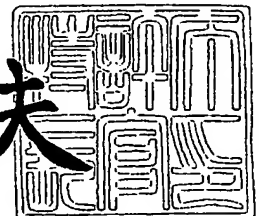
出 願 人
Applicant(s): 科学技術振興事業団

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 0 月 2 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 8 7 8 8 3

【書類名】 特許願
【整理番号】 P2174JST
【提出日】 平成14年 9月30日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G02B 21/00
【発明者】

【住所又は居所】 茨城県日立市鮎川町 6 - 9 A 3 0 1

【氏名】 林 照剛

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市佐和 3 0 6 4 - 1

【氏名】 前川 克廣

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県日立市鮎川町 6 - 9 B 4 0 5

【氏名】 柴田 隆行

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100082876

【弁理士】

【氏名又は名称】 平山 一幸

【電話番号】 03-3352-1808

【選任した代理人】

【識別番号】 100069958

【弁理士】

【氏名又は名称】 海津 保三

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 031727

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013677

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 液晶を用いた共焦点顕微鏡及び液晶を用いた共焦点顕微鏡によるマイクロアレイ基板からの蛍光測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 照明光源から偏光を、ビームスプリッター、マイクロレンズアレイを上部に配置したマトリクス式液晶素子及び対物レンズを介して被観察物へ入射する入射光学系と、

被観察物からの反射光または蛍光を、上記ビームスプリッターとレンズを介して検出する撮像素子を含む検出光学系と、

上記マトリクス式液晶素子の各画素を制御する液晶制御部を有する制御系と、を備えた共焦点顕微鏡であって、

上記マイクロレンズアレイを透過したマイクロレンズ毎の光を、上記マトリクス式液晶素子の各画素毎に透過させ、上記対物レンズにより上記被観察物に複数の焦点を結ばせると共に、

上記マトリクス式液晶素子の各画素を透過する光の偏光方向を上記液晶制御部を用いて制御することを特徴とする、液晶を用いた共焦点顕微鏡。

【請求項 2】 前記液晶制御部が、マトリクス式液晶素子の各画素を透過する光の偏光方向を互いに直交するように制御することを特徴とする、請求項 1 に記載の液晶を用いた共焦点顕微鏡。

【請求項 3】 前記マトリクス式液晶素子の下部に偏光子を配置したことを特徴とする、請求項 1 に記載の液晶を用いた共焦点顕微鏡。

【請求項 4】 前記偏光子を透過した光の偏光が、前記マトリクス式液晶の各画素で制御されることを特徴とする、請求項 3 に記載の液晶を用いた共焦点顕微鏡。

【請求項 5】 照明光源からの偏光を、ビームスプリッター、レンズ、第一のマイクロレンズアレイを上部に配置した第一のマトリクス式液晶素子を介して被観察物へ入射する入射光学系と、

被観察物からの反射光または蛍光を、ビームスプリッター、レンズ、第二のマイクロレンズアレイを上部に配置した第二のマトリクス式液晶素子、集光レンズ

を介して検出する撮像素子を含む検出光学系と、

上記第一及び第二のマトリクス式液晶素子の各画素を透過する光の偏光方向を制御する第一及び第二の液晶制御部を有する制御系と、

を備えた共焦点顕微鏡であって、

上記第一のマイクロレンズアレイを透過したマイクロレンズ毎の光を、上記第一のマトリクス式液晶素子の各画素毎に透過させ、上記被観察物に複数の焦点を結ばせ、

さらに、上記第二のマイクロレンズアレイを透過したマイクロレンズアレイ毎の上記反射光または蛍光を、上記第二のマトリクス式液晶素子の画素毎に透過させ、上記撮像素子に複数の焦点を結ばせると共に、

上記第一及び第二のマトリクス式液晶素子の各画素を透過する光の偏光方向を、上記第一及び第二の液晶制御部を用いて制御することを特徴とする、液晶を用いた共焦点顕微鏡。

【請求項 6】 前記入射光学系の第一の液晶制御部が、第一のマトリクス式液晶素子の各画素を透過する光の偏光方向を、互いに直交するように制御することを特徴とする、請求項 5 に記載の液晶を用いた共焦点顕微鏡。

【請求項 7】 前記検出光学系の第二の液晶制御部が、第二のマトリクス式液晶素子の各画素を透過する光の偏光方向を、互いに直交するように制御することを特徴とする、請求項 5 に記載の液晶を用いた共焦点顕微鏡。

【請求項 8】 前記第一のマトリクス式液晶素子の下部に偏光子を配置したことを特徴とする、請求項 5 に記載の液晶を用いた共焦点顕微鏡。

【請求項 9】 前記偏光子を透過した光の偏光方向が、前記第一のマトリクス式液晶の各画素で制御されることを特徴とする、請求項 8 に記載の液晶を用いた共焦点顕微鏡。

【請求項 10】 選択的に標識となる蛍光物質が、予め付与されているマイクロアレイ基板の蛍光測定において、

請求項 1 乃至 9 の何れかに記載の液晶を用いた共焦点顕微鏡を使用して、上記蛍光物質からの蛍光を観察することを特徴とする、液晶を用いた共焦点顕微鏡によるマイクロアレイ基板からの蛍光測定方法。

【請求項 11】 前記マイクロアレイ基板が、微量の DNA または生体物質を含んでいることを特徴とする、請求項 10 に記載の液晶を用いた共焦点顕微鏡によるマイクロアレイ基板の蛍光測定方法。

【請求項 12】 前記マイクロアレイ基板が、DNA チップであることを特徴とする、請求項 10 または 11 に記載の液晶を用いた共焦点顕微鏡によるマイクロアレイ基板の蛍光測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生体組織や生体組織からの蛍光観察などに使用される共焦点顕微鏡に関し、横方向、深さ方向の分解能に優れ、広領域の動的な観察が可能である、液晶を用いた共焦点顕微鏡及び液晶を用いた共焦点顕微鏡によるマイクロアレイ基板からの蛍光測定方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

従来、生命科学の研究分野における生体組織や蛍光試薬を添加した生体組織試料からの蛍光発光の観察に共焦点顕微鏡が使用されている。共焦点顕微鏡は、深さ方向に高い分解能を有することから、生体試料の三次元観察などに主に利用されてきた。

【0003】

図 8 は、従来例 1 の共焦点顕微鏡の構成を示す図である（例えば、非特許文献 1 参照。）。

レーザ光 61 は、ビームスプリッター 62 で反射され、対物レンズ 63 で試料 64 に結像される。そして、試料 64 で反射した反射光、または、蛍光 66 がビームスプリッター 62 を透過してミラー 67 とレンズ 69 を通過して検出器 71 に入る。ここで、検出器 71 の前にピンホール 70 を置くことによって、焦点面以外から発生する光束を除去し明確な像を得ることができる。

試料 64 全体を見るためには、試料 64 を載置しているステージを平面内で移動、即ち、走査 72 を行うことによって観察するようにしている。

【0004】

共焦点顕微鏡において、試料の移動を行わないで高速で走査する方法が1884年にPaul Nipkowが発明したニポウディスク方式である。図9は、従来例2のニポウディスクを用いた多重共焦点顕微鏡の走査方式の原理を示す図である（例えば、特許文献1、非特許文献2参照。）。

多重共焦点顕微鏡80では、レーザ光81が、共焦点用走査装置90に入射する。共焦点用走査装置90は、2枚の円板で構成された集光ディスク91及びピンホールディスク92と、ドラム94と、ビームスプリッター82と、から構成されている。集光ディスク91及びピンホールディスク92は、ドラム94に保持され、モーター95により回転している。

ここで、レーザ光81は、集光ディスク91に設けられた多数のピンホール93を通過する。この通過した光は、ビームスプリッター82を介して、レンズ83により、被観察物84に複数の焦点を形成する。そして、被観察物84からの反射光は、ビームスプリッター82を介して、光路が入射方向に対して90°曲げられて、レンズ85によりカメラ86に結像される。これにより、光の利用効率を向上させ、複数の焦点同時検出による多重共焦点顕微鏡を実現している。

【0005】

図10は、従来例3の多重共焦点顕微鏡の構成を示す図である（例えば、特許文献2参照。）。

多重共焦点顕微鏡100は、図8の従来例1と同様な光学系を有しているが、入射光の光路に液晶セル103が配設されている点が異なる。

入射光101が、ビームスプリッター102を通過し、液晶セル103を介して、対物レンズ104で試料105に集光される。試料105からの反射光は、ビームスプリッター102を介してレンズ107を通過して、反射光108がカメラ109に結像される。

ここで、入射光101は、液晶セルの1画素である開口部103aを通り、試料105の110aの点に結像する。次に液晶セルの他の画素である103bを開くすると、入射光は、試料105の110bの点に結像する。このように、試料105の走査は、液晶セルの平面にある画素を順番に、入射光101をオンオ

フさせる、所謂 X-Y 走査により行われる。

【0006】

【特許文献1】

特開平5-60980号公報(頁3、図1)

【特許文献2】

特開平5-210051号公報(頁2-3、図1及び図2)

【非特許文献1】

Mark Schena 著, 加藤郁之進 監訳「DNAマイクロアレイ基板」,
丸善株式会社, 2000年, p.19-45

【非特許文献2】

川村信一郎 他3名, 「共焦点顕微鏡レーザ顕微鏡スキャナとCCD
カメラ」横河技報, 2001年, Vol.45, No.2, p.112-114

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

従来例1の試料走査型の共焦点顕微鏡は、単焦点での検出を行うため、広領域を観察するには走査を行う必要があり、蛍光などの実時間観察が困難であるという課題がある。

【0008】

従来例2の多重共焦点顕微鏡は、多数の点を同時に検出することから、隣接する焦点に入射する光同士が干渉する。これを、クロストークと呼んでいる。この干渉によって生じる入射光強度分布が、明暗の模様である干渉縞を生じさせる。これが原因で、照明光強度分布が不均一となるために、観察像の横分解能が低下するという課題がある。また、各焦点毎に光強度にばらつきが生じるという課題がある。さらに、共焦点顕微鏡の応用として、DNAチップからのばらつきの大きい蛍光信号を検出器上で一度に観察できないという課題がある。

【0009】

従来例3の多重共焦点顕微鏡では、液晶セルの多数の点を順番に開閉することにより走査を行うことで、従来例2の走査のように機械的な走査機構が不要となる。しかし、液晶セルの各画素をオンオフさせるために、画素数分のX-Y走査

をさせる必要があるので、一画面を走査するのに時間がかかり、実時間で試料全体の蛍光などの検出をすることが困難であるという課題がある。

【0010】

本発明の目的は、以上の点に鑑みて、横方向と深さ方向の分解能に優れ、広領域の動的な観察が可能である、液晶を用いた共焦点顕微鏡及び液晶を用いた共焦点顕微鏡によるマイクロアレイ基板からの蛍光測定方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決するため、本発明の液晶を用いた共焦点顕微鏡は、照明光源から偏光を、ビームスプリッター、マイクロレンズアレイを上部に配置したマトリクス式液晶素子及び対物レンズを介して被観察物へ入射する入射光学系と、被観察物からの反射光または蛍光を、ビームスプリッターとレンズを介して検出する撮像素子を含む検出光学系と、マトリクス式液晶素子の各画素を制御する液晶制御部を有する制御系と、を備えた共焦点顕微鏡であって、マイクロレンズアレイを透過したマイクロレンズ毎の光を、マトリクス式液晶素子の各画素毎に透過させ、対物レンズにより被観察物に複数の焦点を結ばせると共に、マトリクス式液晶素子の各画素を透過する光の偏光方向を液晶制御部を用いて制御することを特徴とする。

前記構成において、液晶制御部は、好ましくは、マトリクス式液晶素子の各画素を透過する光の偏光方向を互いに直交するように制御する。また、マトリクス式液晶素子の下部に偏光子を配置してもよい。偏光子を透過した光の偏光が、マトリクス式液晶の各画素で制御されるようにしてもよい。

【0012】

この構成によれば、被観察物に照射する光が、マイクロレンズアレイにより、マトリクス式液晶素子の各画素をピンホールとして入射し、被観察物に第一の複数の焦点を形成する。さらに、被観察物の反射光または蛍光が、検出光学系において、第二の複数の焦点を形成することから、本発明の顕微鏡は、共焦点顕微鏡として動作する。この際、マトリクス式液晶素子の各画素において、各画素を透過する光の偏光方向が互いに直交するように、マトリクス式液晶素子の各画素が

制御される。

これにより、被観察物の走査制御を行わないで、被観察物の反射光または蛍光の観察を高速に行うことができる。また、多重共焦点間におけるクロストークを防止でき、分解能が向上する。

【0013】

また、本発明の液晶を用いた共焦点顕微鏡は、照明光源からの偏光を、ビームスプリッター、レンズ、第一のマイクロレンズアレイを上部に配置した第一のマトリクス式液晶素子を介して被観察物へ入射する入射光学系と、被観察物からの反射光または蛍光を、ビームスプリッター、レンズ、第二のマイクロレンズアレイを上部に配置した第二のマトリクス式液晶素子、集光レンズを介して検出する撮像素子を含む検出光学系と、第一及び第二のマトリクス式液晶素子の各画素を透過する光の偏光方向を制御する第一及び第二の液晶制御部を有する制御系と、を備えた共焦点顕微鏡であって、第一のマイクロレンズアレイを透過したマイクロレンズ毎の光を、第一のマトリクス式液晶素子の各画素毎に透過させ、被観察物に複数の焦点を結ばせ、さらに、第二のマイクロレンズアレイを透過したマイクロレンズアレイ毎の反射光または蛍光を、第二のマトリクス式液晶素子の画素毎に透過させ、撮像素子に複数の焦点を結ばせると共に、第一及び第二のマトリクス式液晶素子の各画素を透過する光の偏光方向を、第一及び第二の液晶制御部を用いて制御することを特徴とする。

前記構成において、入射光学系の第一の液晶制御部は、好ましくは、第一のマトリクス式液晶素子の各画素を透過する光の偏光方向を互いに直交するように制御する。

検出光学系の第二の液晶制御部は、第二のマトリクス式液晶素子の各画素を透過する光の偏光方向を互いに直交するように制御してもよい。また、第一のマトリクス式液晶素子の下部に偏光子を配置してもよい。さらに、偏光子を透過した光の偏光方向が、第一のマトリクス式液晶の各画素で制御されてもよい。

【0014】

この構成によれば、被観察物に照射する入射光が、第一のマイクロレンズアレイにより、第一のマトリクス式液晶素子の各画素に入射し、被観察物に第一の複

数の焦点を形成する。さらに、被観察物の反射光または蛍光が、検出光学系の第二のマイクロレンズアレイ及び第二のマトリクス式液晶素子の各画素を通過して、第二の複数の焦点を形成することから、本発明の顕微鏡は、共焦点顕微鏡として動作する。この際、第一及び第二のマトリクス式液晶素子の各画素において、各画素を透過する光の偏光方向が互いに直交するように、各マトリクス式液晶素子の各画素が制御される。これにより、被観察物の走査制御を行わないで、被観察物の反射光または蛍光の観察を高速に行うことができる。また、多重共焦点間におけるクロストークを防止でき、横方向及び深さ方向の分解能が向上する。さらに、第一及び第二のマトリクス式液晶素子の組み合わせにより、偏光制御、検出信号の選択等を動的に実現することができる。

【0015】

また、本発明の液晶を用いた共焦点顕微鏡によるマイクロアレイ基板からの蛍光測定方法は、選択的に標識となる蛍光物質が予め付与されているマイクロアレイ基板の蛍光測定において、本発明の液晶を用いた共焦点顕微鏡を使用して、蛍光物質からの蛍光を観察することを特徴とする。

上記構成において、マイクロアレイ基板は、微量のDNA、または、生体物質を含んでおり、これらを平板状に配置した被観察物である。また、マイクロアレイ基板は、DNAチップであってもよい。

この構成によれば、本発明の液晶を用いた共焦点顕微鏡に使用することで、マイクロアレイ基板の走査無しに効率よく、蛍光の観察ができる。

【0016】

【発明の実施の形態】

以下、この発明の実施の形態を図面を参照して詳細に説明する。

始めに本発明の液晶を用いた共焦点顕微鏡の第1の実施の形態を示す。

図1は、本発明に係る第1の実施の形態による液晶を用いた共焦点顕微鏡の構成を示す模式図である。図1において、液晶を用いた共焦点顕微鏡1は、照明光学系10と、マトリクス式液晶素子を含み被観察物へ多重焦点を形成する入射光学系20と、照明被観察物からの反射光を検出する検出光学系30と、マトリクス式液晶素子及び検出光学系からの画像データを制御する制御系50と、被観察

物 2 を載置するステージ 3 から構成される。

【0017】

照明光学系 10 は、照明光源 11 と、コリメータ 12 と、第一の偏光子 13 と、ビームスプリッター 14 とからなっている。照明光源 11 は、例えばレーザー光源で、出射した光は、レンズ 12 a 及びレンズ 12 b からなるコリメータ 12 によって、所望のビーム径の平行光に拡大して、偏光子 13 を通って、ビームスプリッター 14 に入射する。レーザー光源の波長は、400 nm から 700 nm 程度の波長でよい。ここで、照明光源 11 として直線偏光のレーザー光源を用いれば、偏光子 13 は省略することができる。

【0018】

入射光学系 20 は、上から順に、マイクロレンズアレイ 21 と、マトリクス式液晶素子 22 と、対物レンズ 23 とからなっている。ビームスプリッター 14 に入射した平行光は、下部方向に反射され、一様な光強度分布の光が、ビームスプリッター 14 の下部に配設されたマイクロレンズアレイ 21 により、焦点がマトリクス式液晶素子 22 の各画素に結ばれる。

【0019】

このマイクロレンズアレイ 21 は、マトリクス式液晶素子 22 の各画素 22 a に対応する位置に、アレイ状に配列した複数の微小レンズから構成されており、マトリクス式液晶素子 22 の各々の画素 22 a 毎に効率よく、光を入射させることができる。マイクロレンズアレイ 21 に入射した各光は、マトリクス式液晶素子 22 の各画素 22 a をピンホールとして通過する。この各画素 22 a をピンホールとして通過した各光は、一度拡大してから、さらに対物レンズ 23 によって、被観察物 2 の表面に複数の焦点 24 として結像される。

【0020】

被観察物 2 は、ステージ 3 に載置されている。ステージ 3 は、前後、左右及び上下方向に移動可能な XYZ ステージ 3 a 及び θ ステージ 3 b から構成されている。XYZ ステージ 3 a によりステージ 3 が水平面内と垂直方向の両方で移動調整されることにより、被観察物 2 の位置調整が行なわれ得る。また、このとき、 θ ステージ 3 b により XYZ 面内の角度調整も行われることにより、被観察物 2

の位置調整が行なわれるようになっている。

【0021】

次に、被観察物からの反射光を検出する検出光学系について説明する。

検出光学系30において、被観察物2からの反射光は、入射光の経路を逆進して、ビームスプリッター14を介して、結像レンズ31へ入射し、複数の焦点32が撮像素子33に形成され、被観察物2の反射光が結像される。

撮像素子33としては、上記の結像を一度に受光できるCCD型撮像素子やCMOS型撮像素子を使用できる。さらに、これらの撮像素子33は、S/N比（信号対雑音比）を向上させるために、雑音を減らすように、例えば液体窒素やペルチェ素子を使用した冷却装置で冷却してもよい。

【0022】

ここで、被観察物の反射光は、照明光源11と同一波長の場合の通常反射光の場合と、照明光源11より励起された被観察物からの励起光である蛍光の場合がある。蛍光の波長は、通常、照明光源の波長よりも長い。従って、蛍光を観測する場合には、ビームスプリッター14として、照明光源の波長と、蛍光波長を分離できるダイクロイックミラーなどを使用することができる。

【0023】

制御系50は、パーソナルコンピュータ51と、第一の液晶制御部52と、画像処理装置53とを備えている。上記パーソナルコンピュータ51は、被観察物の画像などを表示するディスプレイ装置54を備えている。

【0024】

さらに、上記パーソナルコンピュータ51は、マトリクス式液晶素子22の各画素を透過する光の偏光方向を制御するデータを、液晶制御部52へ出力する。上記液晶制御部52は、マトリクス式液晶素子22の各画素22aで回転させる光の偏光方向を、液晶素子駆動信号に変換する駆動回路である。この駆動回路は、パーソナルコンピュータ51からのマトリクス式液晶素子22の各画素22aの偏光信号を、マトリクス式液晶素子22に適合する液晶素子駆動信号、即ち各画素22aに関する電圧信号に変換する。そして、液晶制御部52が、各画素22aに印加する駆動電圧を適宜に調整し、または、駆動時間中に駆動電圧を変更

することにより、各画素 22 a を透過する光の偏光方向を制御するようになっている。

【0025】

撮像素子 33 の画像信号 33 a は、制御系 50 の画像処理装置 53 に出力されて、パーソナルコンピュータ 51 により、画像データの演算処理などがされて、ディスプレイ装置 54 に画像が出力される。

【0026】

次に、マトリクス式液晶素子の偏光制御について説明する。

マトリクス式液晶素子 22 の各画素 22 a は、制御系 50 を構成する第一の液晶制御部 51 によって、マトリクス式液晶素子 22 の各々の画素 22 a を透過する光の偏光方向を制御する。これによって、隣り合う各画素に入射する光の偏光方向が、互いに直角になるように制御される。この際、マトリクス式液晶素子の画素全部が、同時にかつ被観察物 2 の観察に必要な時間だけ制御されるので、複数の焦点 24 を同時に被観察物に形成することができる。

【0027】

図 2 及び図 3 は、マトリクス式液晶素子の各画素の偏光制御を模式的に示す図である。図 2 に示すように、コリメータ 12 からの平行光 15 は、第一の偏光子 13 と、マイクロレンズアレイ 21 を介して、マトリクス式液晶素子 22 へ入射する。上記第一の偏光子 13 は、公知の構成であって、例えば二枚のガラス板の間に偏光膜を挟んで貼り合わせるにより構成されている。

入射する平行光が第一の偏光子 13 により、図 2 で示すように \longleftrightarrow 方向の照明光偏光 16 になり、マトリクス式液晶の各画素 22 a により 17 a, 17 b, 17 c のように、入射光の偏光 16 が制御される。ここで、マトリクス式液晶素子による偏光 17 の偏光 17 a, 17 b, 17 c は、それぞれ、照明光の偏光 16 に対して、垂直、平行、垂直と平行の中間状態を示している。

【0028】

図 3 は、マトリクス式液晶素子 22 における各画素 22 a を透過する光の偏光状態を示している。図中の a と b は、それぞれ、偏光が入射光と平行及び垂直の状態である。従って図示の場合は、隣接する各画素 22 a を透過する光の偏光方

向が、互いに直交するようになっている。このように、マトリクス式液晶素子 22 の隣接する各画素 22a を透過する光の偏光方向を制御すると、互いに隣接する a と b の入射光は振動成分が直交し干渉が生じない。

【0029】

ここで、干渉するのは、対角に位置する a と a および b と b の画素となる。対角に位置する a と a、b と b の焦点の間隔は、隣接する焦点 a と b の間隔に比 $2^{1/2}$ に広がることから、隣接する入射光の偏光を制御しない場合と比較すると $2^{-1/2}$ の 0.71 倍まで、隣接する焦点の間隔を近づけることができる。従って、従来と比較して約 30% の横分解能の向上ができる。これにより、マトリクス式液晶を使用することで、隣接する焦点に集光される光の偏光方向は互いに直交するので、隣接する照明光同士は干渉せず、クロストークによる横分解能の低下を防ぐことができる。

【0030】

次に、本発明の液晶を用いた共焦点顕微鏡の動作について説明する。

被観察物 2 に照射される光は、マイクロレンズアレイ 21 により、マトリクス式液晶素子 22 の各画素 22a をピンホールとして入射し、被観察物 2 に第一の複数の焦点 24 を形成する。さらに、被観察物 2 の反射光または蛍光が、検出光学系 30 において、第二の複数の焦点 32 を形成することから、本発明の顕微鏡は、共焦点顕微鏡として動作する。

この際、マトリクス式液晶素子 22 の各画素 22a において、各画素 22a を透過する光の偏光方向が互いに直交するように、マトリクス式液晶素子の各画素 22a が制御されることができる。これにより、多重共焦点間におけるクロストークを防止でき、横方向及び深さ方向の分解能が向上する。また、被観察物 2 の機械的な走査を行わないで、被観察物 2 の反射光または蛍光の観察を高速に行うことができる。

【0031】

ここで、マトリクス式液晶素子 22 の各画素 22a の間隔であるピッチ分は、厳密には、像が得られないので、ステージ 3 を 1 ピッチ分だけ X 方向及び Y 方向に移動させて、1 画面を構成してもよい。ここで、マトリクス式液晶素子 22 の

画素のピッチは、 $10\mu\text{m}$ から $20\mu\text{m}$ 程度である。この1ピッチ分のステージのX-Y駆動制御は、電歪素子による駆動装置をステージ3に付加することで行うことができる。

【0032】

次に、本発明において、液晶を用いた共焦点顕微鏡の第1の実施の形態の変形例を示す。

図4は、本発明による液晶を用いた共焦点顕微鏡の別の構成を示す図である。図4に示す共焦点顕微鏡1'が、図1に示す液晶を用いた共焦点顕微鏡1と異なるのは、入射光学系20である。他の照明光学系10、検出光学系30、制御系50、ステージ3は、図1と同じ構成であるので、説明は省略する。

入射光学系20において、マトリクス式液晶素子22の下部に第二の偏光子25を設けている点が、図1の入射光学系と異なる。

【0033】

図5は、入射光学系に設けた偏光子25の作用効果を説明する概略図である。図5に示すように、コリメータ12からの平行光15が第一の偏光子13と、マイクロレンズアレイ21と、マトリクス式液晶素子22を通過して入射する。ここで、上記第一の偏光子13及び第二の偏光子25は、同軸ではなく、互いに直交(90°)するように配置している。

【0034】

マトリクス式液晶素子の画素22aが駆動電圧を印加されない状態では、第一の偏光子13を透過した光が、画素22aを透過することで、17に示すようにその偏光方向が 90° 振れるために、第一の偏光子13と透過軸が 90° ずれている第二の偏光子25を透過し、透過光26aとなる。

【0035】

一方、画素22aが駆動電圧を印加された状態では、電圧の大きさによって画素22a内の液晶分子の振れの状態が変化するため、第一の偏光子13を透過した直線偏光の偏光方向を当該画素22a内で $0\sim 90^\circ$ の範囲で回転させることができる。これにより、第二の偏光子25を透過する光の強度が任意に制御される。従って、マトリクス式液晶素子22の各画素22aの駆動電圧により、入射

光が、透過 26 a、透過しない遮光 26 b、これらの中間状態（グレー） 26 c となるように制御されるので、照明光強度を変えることができる。

【0036】

ここで、本発明の液晶を用いた共焦点顕微鏡の動作の特徴について説明する。この例では、第二の偏光子 25 を追加したことにより、照明光の強度制御を行うことができる。これにより、被観察物に応じて、マトリクス式液晶素子の各画素 22 a を制御することで、照明光強度の制御ができることになる。

【0037】

次に、本発明の液晶を用いた共焦点顕微鏡の第 2 の実施の形態を示す。

図 6 は、本発明に係る第 2 の実施の形態による液晶を用いた共焦点顕微鏡の構成を示す模式図である。図 6 において、液晶を用いた共焦点顕微鏡 5 は、照明光学系 10 と、マトリクス式液晶素子を含み被観察物 2 へ多重焦点を形成する入射光学系 20' と、被観察物からの反射光を検出する検出光学系 30' と、マトリクス式液晶素子及び検出光学系からの画像データを制御する制御系 50' と、被観察物 2 を載置するステージ 3 とから構成される。なお、図 1 と同一の構成要素には、同じ符号を付して説明は省略する。

照明光学系 10 は、図 1 の照明光学系と同様に、照明光源 11 と、コリメータ 12 と、第一の偏光子 13 から構成され、偏光した平行光をビームスプリッター 14 に入射させる。

【0038】

入射光学系 20' は、対物レンズ 26 と、レンズ 27 と、マイクロレンズアレイ 21 と、マトリクス式液晶素子 22 とから構成されている。ビームスプリッター 14 からの偏光した平行光は、対物レンズ 26 とレンズ 27 を用いてさらに拡大される。この拡大された一様な光強度分布の光が、第一のマイクロレンズアレイ 21 の全面に照射される。

第一のマトリクス式液晶素子 22 の表面に取り付けられた第一のマイクロレンズアレイ 21 を通過したマイクロレンズ毎の光は、第一のマトリクス式液晶素子 22 の各画素 22 a 毎に透過し、ステージ 3 に載置された被観察物 2 に複数の焦点 24 を形成する。

【0039】

この際、マトリクス式液晶素子 22 の各画素 22a は、図 2 及び図 3 で説明したように、制御系 50' を構成する第一の液晶制御部 51 によって、第一のマトリクス式液晶素子 22 の各画素 22a の隣り合う画素の偏光方向を互いに直交させるように制御する。これにより、第一のマトリクス式液晶 22 を使用することで、隣接する焦点に集光される入射光の偏光方向が、互いに直交するので、隣接する入射光同士は干渉せず、クロストークによる横分解能の低下を防ぐことができる。

【0040】

次に、被観察物 2 からの反射光または蛍光を、ビームスプリッター 14 を通過した後に検出する検出光学系 30' について説明する。

検出光学系 30' は、ミラー 34、フィルタ 35、対物レンズ 36、レンズ 37、第二のマイクロレンズアレイ 38、第二のマトリクス式液晶素子 39、集光レンズ 40、撮像素子 33 から構成されている。

ここで、対物レンズ 36 から、第二のマトリクス式液晶素子 39 までの光学系は、入射光学系 20' の対物レンズ 26 から第一のマトリクス式液晶素子 22 までの構成と同じにする。

ミラー 34 は、ビームスプリッター 14 を通過した被観察物からの反射光の光路を 90° 曲げて、特定の波長の光のみを通過させるフィルタ 35 を介して、対物レンズ 36 に入射させる。

【0041】

被観察物 2 からの蛍光を観察する場合には、蛍光の波長は照明光源 11 より波長が長いことから、蛍光のみを検出光学系 30' に透過させるために、ビームスプリッター 14 としてダイクロイックミラーを使用すればよい。

さらに、蛍光のコントラスト向上のため、フィルタ 35 としては、蛍光のみを透過させるエミッションフィルタを用いることが好ましい。

【0042】

次に、対物レンズ 36 とレンズ 37 は、被観察物 2 からの反射光または蛍光をさらに拡大し、一様な光強度分布の光を第二のマイクロレンズアレイ 38 の全面

に照射する。この第二のマイクロレンズアレイ 38 は、第一のマイクロレンズアレイ 21 と同じく、第二のマトリクス式液晶素子 39 の各画素に対応する位置にアレイ状に配列した微小レンズから構成されており、第二のマトリクス式液晶素子 39 の各々の画素毎に効率よく、光を入射させることができる。

第二のマトリクス式液晶素子 39 の表面に取り付けられた第二のマイクロレンズアレイ 38 を通過したマイクロレンズ毎の光は、第二のマトリクス式液晶素子 39 の各画素毎に通じ、集光レンズ 40 により撮像素子 33 に複数の焦点 41 を形成する。

【0043】

制御系 50' は、図 1 の制御系 50 にさらに、検出光学系 30' の第二のマトリクス式液晶素子 39 の制御部である第二の液晶制御部 55 を備えたほかは、同じ構成である。

入射光学系のマトリクス式液晶素子 22 は、図 2 及び図 3 で説明したように、制御系 50' を構成する第一の液晶制御部 52 によって、マトリクス式液晶素子 22 の各画素 22a の隣り合う画素を透過する光の偏光方向を互いに直交させるように制御される。

【0044】

検出光学系 30' に入射する反射光または蛍光において、それらの偏光方向が同一となり干渉の影響を受ける場合には、検出光学系の第二のマトリクス式液晶素子 39 を透過する際に、反射光または蛍光の偏光方向を互いに直交させればよい。これにより、撮像素子に入射する互いに隣接する反射光または蛍光同士は、干渉せず、クロストークによる横分解能の低下を防ぐことができる。

【0045】

また、検出光学系 30' の第二のマトリクス式液晶素子 39 の画素を透過する反射光に対して偏光方向の制御を行うこともできる。この際、検出光学系 30' のマトリクス式液晶素子 39 の各画素を、透過、遮光あるいはその中間の状態に制御できるので、視野の限定などができる。

【0046】

ここで、本発明の液晶を用いた共焦点顕微鏡の動作について説明する。

被観察物 2 に照射する光が、第一のマイクロレンズアレイ 21 により、第一のマトリクス式液晶素子の各画素 22 a へ入射し、被観察物 2 に第一の複数の焦点 24 を形成する。

さらに、被観察物 2 の反射光または蛍光が、検出光学系 30' において、第二のマイクロレンズアレイ 38 と、第二のマトリクス式液晶素子 39 の各画素を使用して第二の複数の焦点 41 を形成することから、本発明の顕微鏡は、共焦点顕微鏡として動作する。この際、マトリクス式液晶素子 22, 39 の各画素を透過する光において、その偏光方向が互いに直交するように、マトリクス式液晶素子 22, 39 の各画素が制御され得る。

【0047】

従って、前記した従来例 1 のように、クロストークが生じない程度離れたピンホールの下に、試料を走査して時系列で画像を測定して合成する必要がある。また、従来例 2 のように、クロストークが生じない程度離れたピンホールの組み毎の画像を、時系列で測定して合成する必要がある。

このため、本発明の液晶を用いた共焦点顕微鏡によれば、マトリクス式液晶素子の全ての画素をピンホールとした画面を形成しても、クロストークによる画面の乱れがなくなり、リアルタイムで被観察物の全画像を観察できる。

これにより、被観察物 2 の機械的な走査制御を行わないで、被観察物 2 の反射光または蛍光の観察を高速に行うことができる。また、多重共焦点間におけるクロストークを防止できるので、横方向と深さ方向の分解能が向上する。また、2 枚のマトリクス式液晶素子の組み合わせにより、偏光制御、検出信号の選択等を実現することができる。

【0048】

次に、本発明において、液晶を用いた共焦点顕微鏡の第 2 の実施の形態の変形例を示す。

図 7 は、本発明による液晶を用いた共焦点顕微鏡の別の構成を示す図である。図示する液晶を用いた共焦点顕微鏡 5' が、図 6 に示す液晶を用いた共焦点顕微鏡 5 と異なるのは、入射光学系 20' である。

他の照明光学系 10、検出光学系 30'、制御系 50'、ステージ 3 は、図 6

と同じ構成であるので、説明は省略する。

本例では、入射光学系 20' において、マトリクス式液晶素子 22 の下部に第二の偏光子 25 を設けている点が図 6 の入射光学系と異なる。

【0049】

この第二の偏光子 25 による作用は、図 4 及び図 5 で説明したように、第一のマトリクス式液晶素子の画素 22 a の駆動電圧により、照明光強度を変えることである。入射光学系の第一のマトリクス式液晶素子 22 の各画素 22 a において、隣り合う各画素 22 a を透過する光の偏光方向を互いに直交させるように、第一のマトリクス式液晶素子 22 の各画素が制御され得る。

【0050】

ここで、被観察物 2 の反射光により撮像素子 33 に形成される複数の焦点 41 間のクロストークは、第二のマトリクス式液晶素子の各画素の偏光制御により防止できる。従って、入射光の照明制御を行なった場合であっても、反射光のクロストークのない像を形成できるので、従来の共焦点顕微鏡のように機械的な走査をして全画面を合成する必要がなく、制御系 50' のディスプレイ装置 54 で、直ちに観察できる。

これにより、被観察物 2 の機械的な走査を行わないで、被観察物 2 の反射光または蛍光の観察を高速に行うことができる。また、多重共焦点間におけるクロストークを防止でき、分解能が向上する。さらに、2 枚のマトリクス式液晶素子と、第二の偏光子 25 との組み合わせにより、照明光制御、偏光制御、検出信号の選択等を実現することができる。

【0051】

次に、液晶式の共焦点顕微鏡を用いたマイクロアレイ基板の測定方法に係る第 3 の実施の形態を示す。

ここで、マイクロアレイ基板は、微量の DNA、または、生体物質を平板状に配置した被観察物である。これらのマイクロアレイ基板は、選択的に標識となる蛍光物質が、予め付与されている。また、このマイクロアレイ基板は、蛍光標識化した未知の一本鎖 DNA とハイブリダイゼーション反応させた DNA マイクロアレイ基板でもよい。

【0052】

上記DNAマイクロアレイ基板を、図6に示す本発明の共焦点顕微鏡5を用いて観察する測定方法について説明する。

共焦点顕微鏡5の第一及び第二のマトリクス式液晶素子22及び39の大きさは、DNAマイクロアレイ基板よりも十分に大きいものを使用する。従って、DNAマイクロアレイ基板の全体の反射像、または、蛍光は、共焦点顕微鏡5を用いて観察できる。

【0053】

先ず、DNAマイクロアレイ基板をステージ3に載置して、照明光源11を点灯する。次に、照明光源11の焦点位置と、DNAマイクロアレイ基板の検出位置が重なるように、観察するDNAマイクロアレイ基板のZ方向位置をXYZステージ3a及びθステージ3bを用いて調節する。

【0054】

次に、DNAマイクロアレイ基板への入射光は、マトリクス式液晶素子22によって、隣接する画素を透過した入射光の偏光方向を互いに直交させるように第一の液晶制御部52により制御される。この際、検出光学系の第二のマトリクス式液晶素子39の各画素もまた、第二の液晶制御部により制御される。

【0055】

このようにして、DNAマイクロアレイ基板で発生した全部の蛍光が、撮像素子33として、例えば、CCDカメラを使用することで、同時に検出できる。そして、検出する信号の強度や偏光方向を変化させて蛍光画像観察を行うことができる。

【0056】

ここで、マトリクス式液晶素子22、39の画素の大きさは、 $10\mu\text{m} \sim 20\mu\text{m}$ であり、例えば、DNAマイクロアレイ基板で発生する一つの蛍光の大きさは直径が $100\mu\text{m}$ 程度であるので、分解能は十分にある。従って、DNAマイクロアレイ基板の蛍光の数や、蛍光発生個所を、直ちに判別することができる。この際、制御系50のパーソナルコンピュータ51を使用して、画像の記録やデータ処理を敏速に行うことができる。

【0057】

本発明の液晶式の共焦点顕微鏡を用いたマイクロアレイ基板の測定方法によれば、マイクロアレイ基板上にマトリクス式液晶素子の画素数に相当する多重の焦点が生じ、その反射光が、再度分離光学系を通して共焦点検出光学系へ入射し、再度マトリクス式液晶素子を通して画素数に相当する多重の焦点が形成される、所謂、共焦点顕微鏡となるので、マトリクス式液晶素子の画素数に対応する被観察物を一度に観察することができる。

これにより、DNAマイクロアレイ基板上で励起された蛍光の鮮明な全体像が、DNAマイクロアレイ基板の機械的な走査なしに、すなわち、リアルタイムで観察できる。

【0058】

本発明は、上記実施の形態に限定されることなく、特許請求の範囲に記載した発明の範囲内で種々の変形が可能であり、それらも本発明の範囲内に含まれることとはいうまでもない。上述した実施形態においては、検出光学系に撮像素子を用いたが、撮像素子位置で、目視の観察や写真撮影なども行うことができるように、検出系は必要に応じて複数の検出系とすることも可能である。

【0059】

【発明の効果】

以上の説明から理解されるように、本発明によれば、液晶を用いた共焦点顕微鏡において、マトリクス式液晶素子を用いることで、被観察物の走査無しに、一度に被観察物の測定を行うことができる。そして、マトリクス式液晶素子の各画素の偏光制御によりクロストークを減少させ、横方向と深さ方向の分解能を向上することができる。

【0060】

また、本発明の共焦点顕微鏡を用いたマイクロアレイ基板の測定方法によれば、マイクロアレイ基板の走査無しに効率よく、蛍光の観察ができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明に係る第1の実施の形態による液晶を用いた共焦点顕微鏡の構成を示す

模式図である。

【図 2】

マトリクス式液晶素子の各画素の偏光制御を模式的に示す図である。

【図 3】

図 2 のマトリクス式液晶素子における各画素を透過する光の偏光状態を示す図である。

【図 4】

本発明に係る第 1 の実施の形態による液晶を用いた共焦点顕微鏡の別の構成を示す図である。

【図 5】

入射光学系に設けた偏光子の作用効果を説明する概略図である。

【図 6】

本発明に係る第 2 の実施の形態による液晶を用いた共焦点顕微鏡の構成を示す模式図である。

【図 7】

本発明によるパターン露光装置の具体的な第一の実施形態の構成を示す概略図である。

【図 8】

従来例 1 の共焦点顕微鏡の構成を示す図である。

【図 9】

従来例 2 のニポウディスクを用いた多重共焦点顕微鏡の走査方式の原理を示す図である。

【図 10】

従来例 3 の多重共焦点顕微鏡の構成を示す図である。

【符号の説明】

- | | |
|--------------|--------------|
| 1, 1', 5, 5' | 液晶を用いた共焦点顕微鏡 |
| 2 | 被観察物 |
| 3 | ステージ |
| 3 a | X Y Z ステージ |

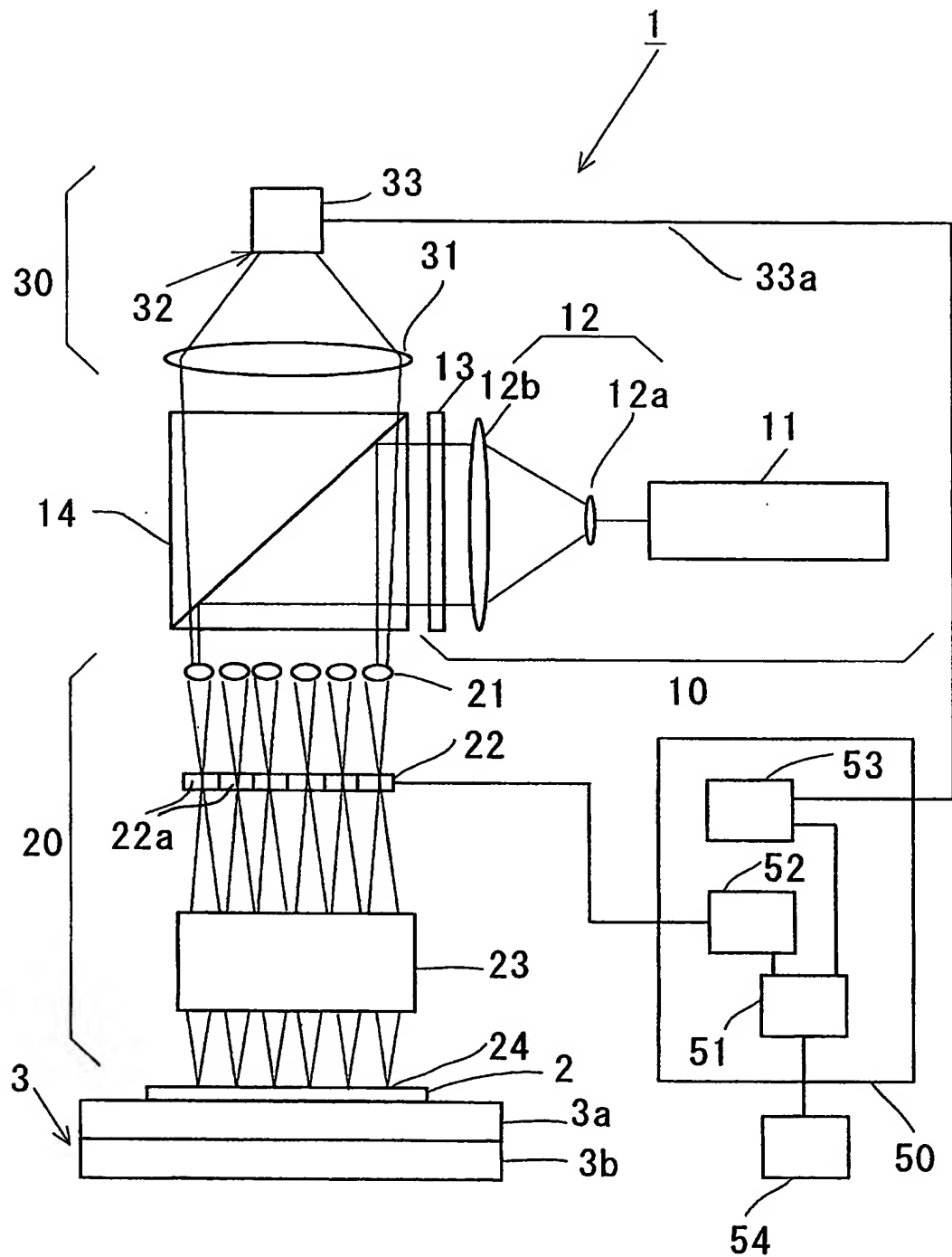
- 3 b θ ステージ
- 1 0 照明光学系
- 1 1 照明光源
- 1 2 コリメータ
- 1 2 a, 1 2 b レンズ
- 1 3 第一の偏光子
- 1 4 ビームスプリッター
- 1 5 コリメータからの平行光
- 1 6 照明光偏光
- 1 7 マトリクス式液晶素子による偏光
- 2 0, 2 0' 入射光学系
- 2 1 マイクロレンズアレイ
- 2 2 マトリクス式液晶素子
- 2 2 a マトリクス式液晶素子の画素
- 2 3 対物レンズ
- 2 4, 4 1 複数の焦点
- 2 5 第二の偏光子
- 2 6 対物レンズ
- 2 7 レンズ
- 3 0, 3 0' 検出光学系
- 3 1 結像レンズ
- 3 2 焦点
- 3 3 撮像素子
- 3 3 a 画像信号
- 3 4 ミラー
- 3 5 フィルタ
- 3 6 対物レンズ
- 3 7 レンズ
- 3 8 第二のマイクロレンズアレイ

- 3 9 第二のマトリクス式液晶素子
- 4 0 集光レンズ
- 5 0, 5 0' 制御系
- 5 1 パーソナルコンピュータ
- 5 2 第一の液晶制御部
- 5 3 画像処理装置
- 5 4 ディスプレー装置
- 5 5 第二の液晶制御部

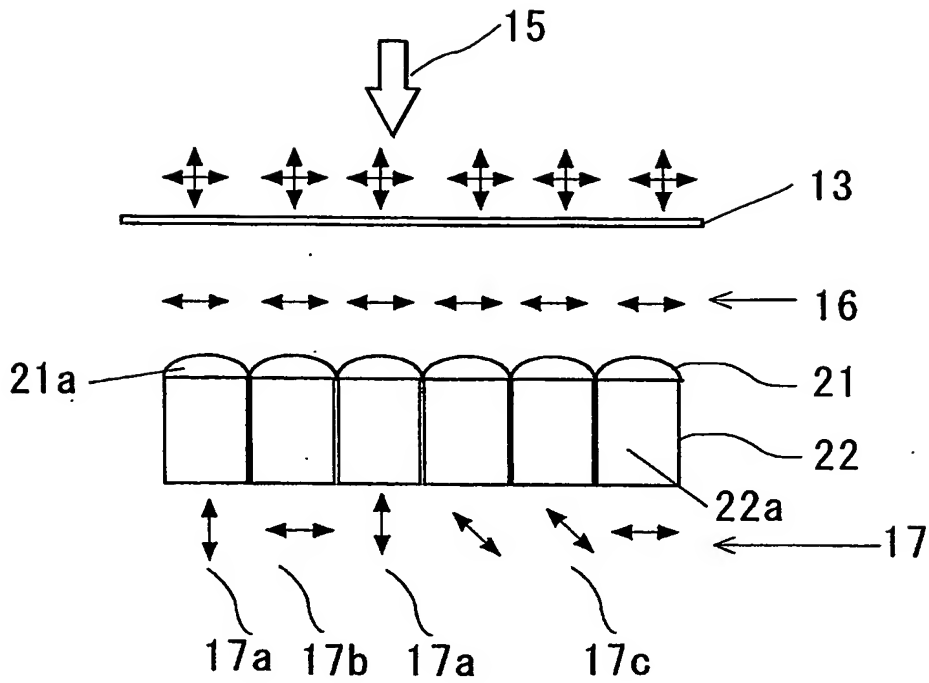
【書類名】

図面

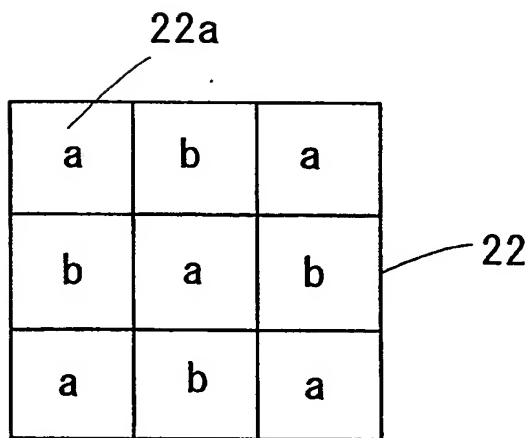
【図 1】



【図 2】

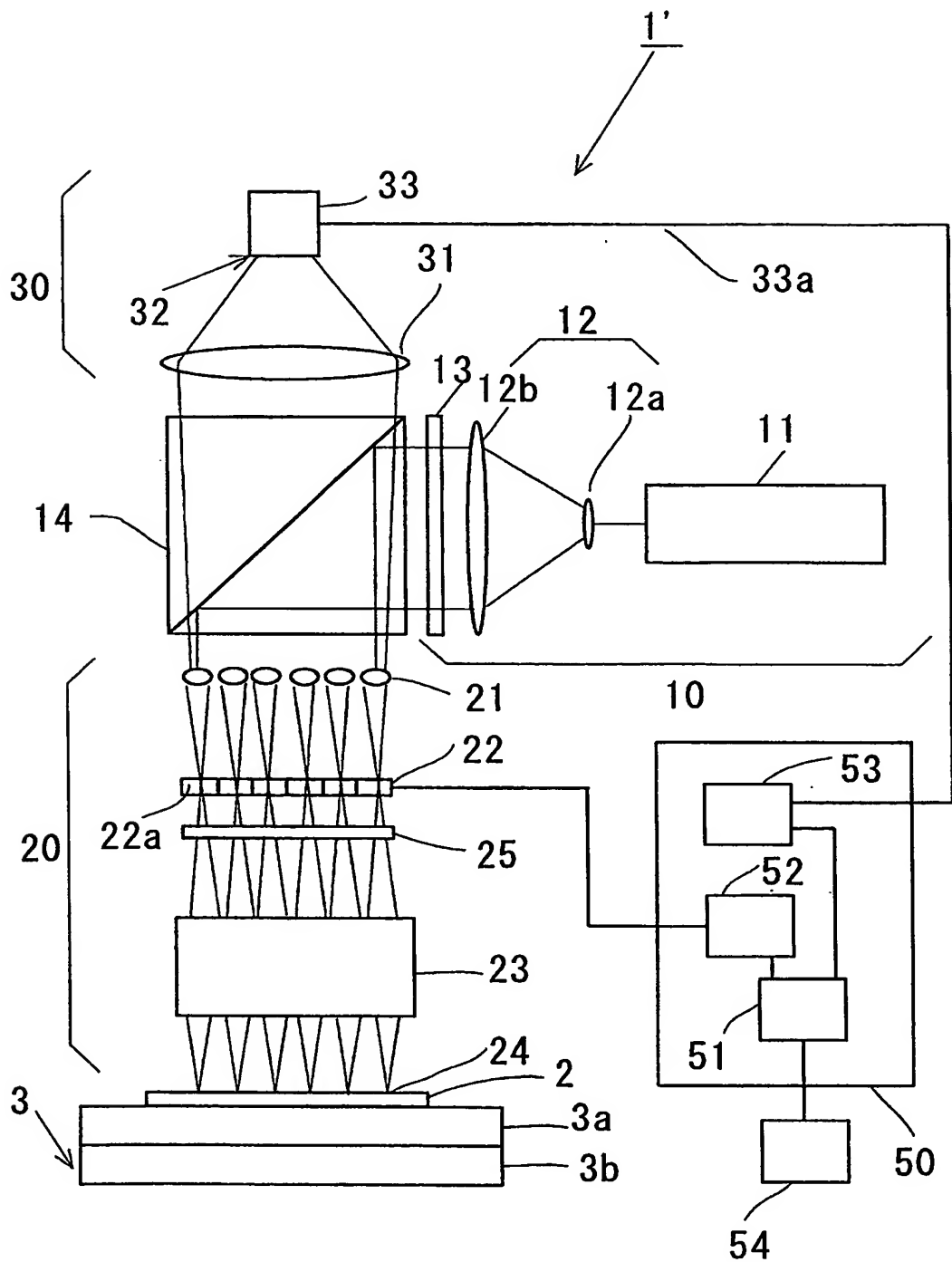


【図 3】

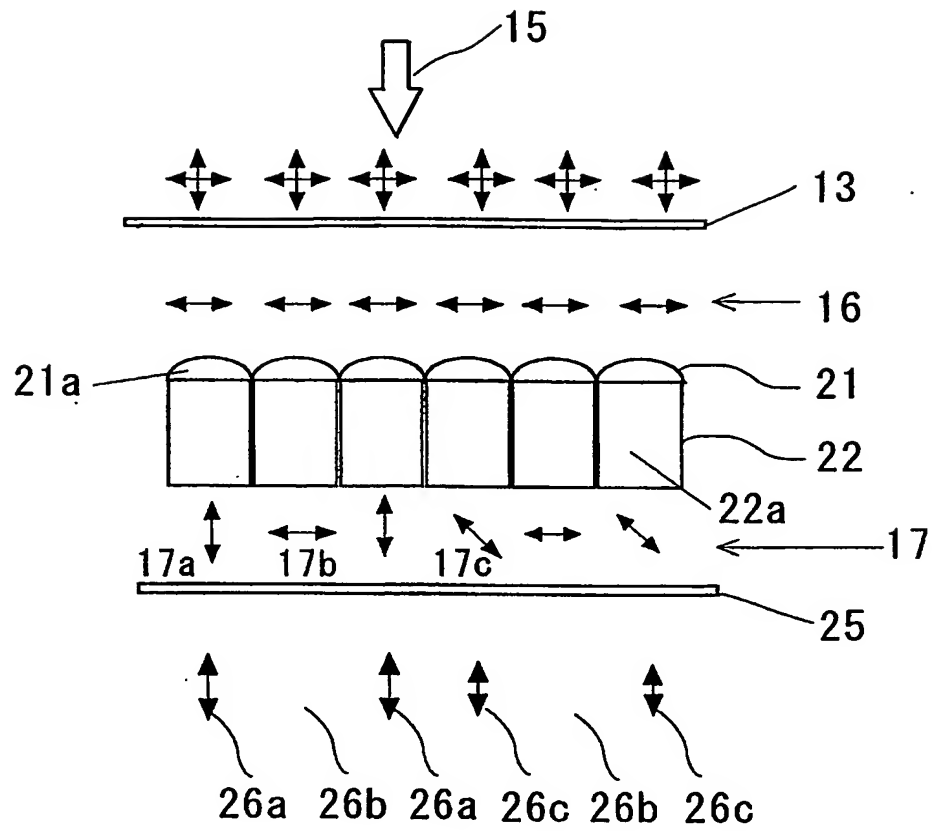


偏光 a: \parallel , b: \perp

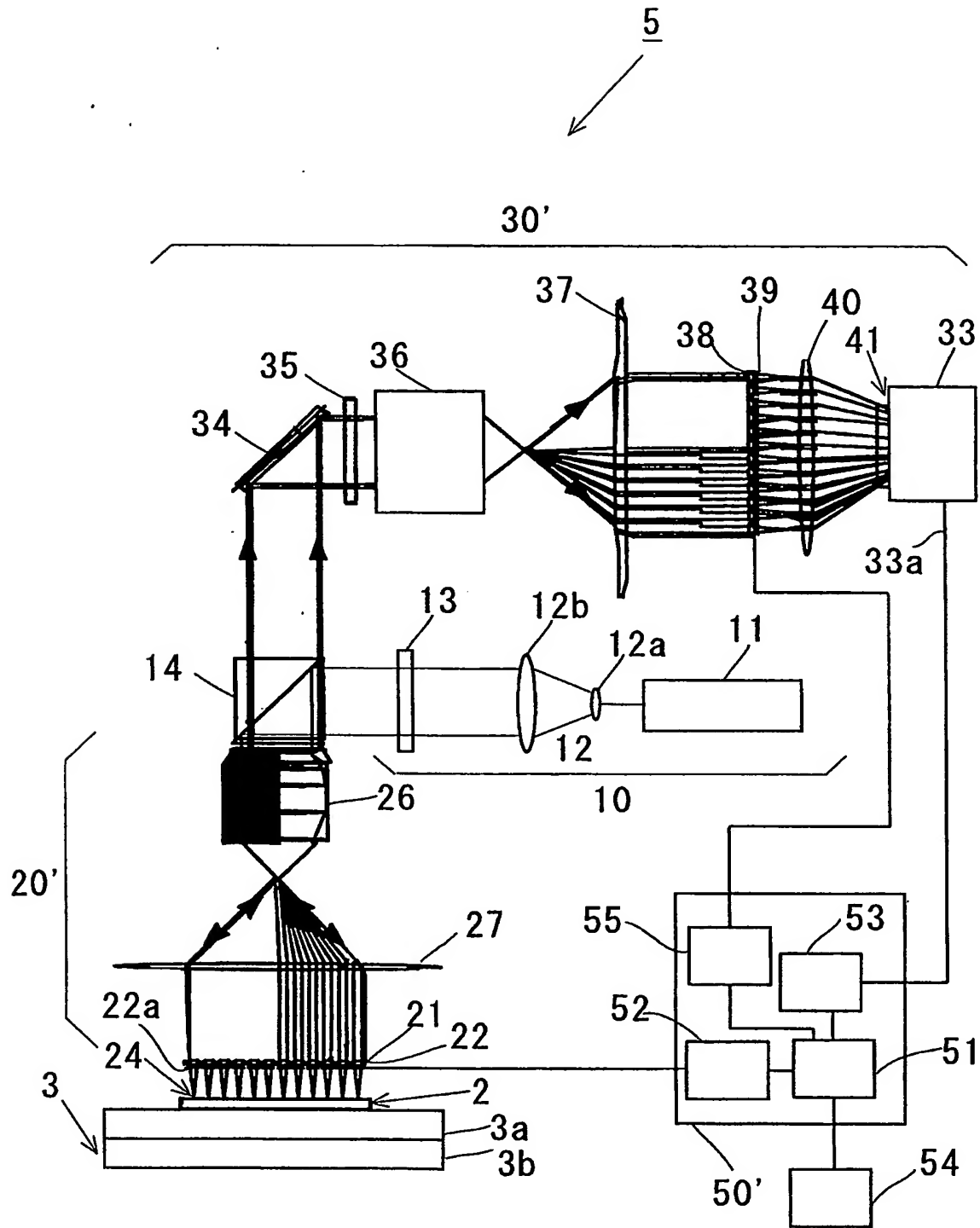
【図 4】



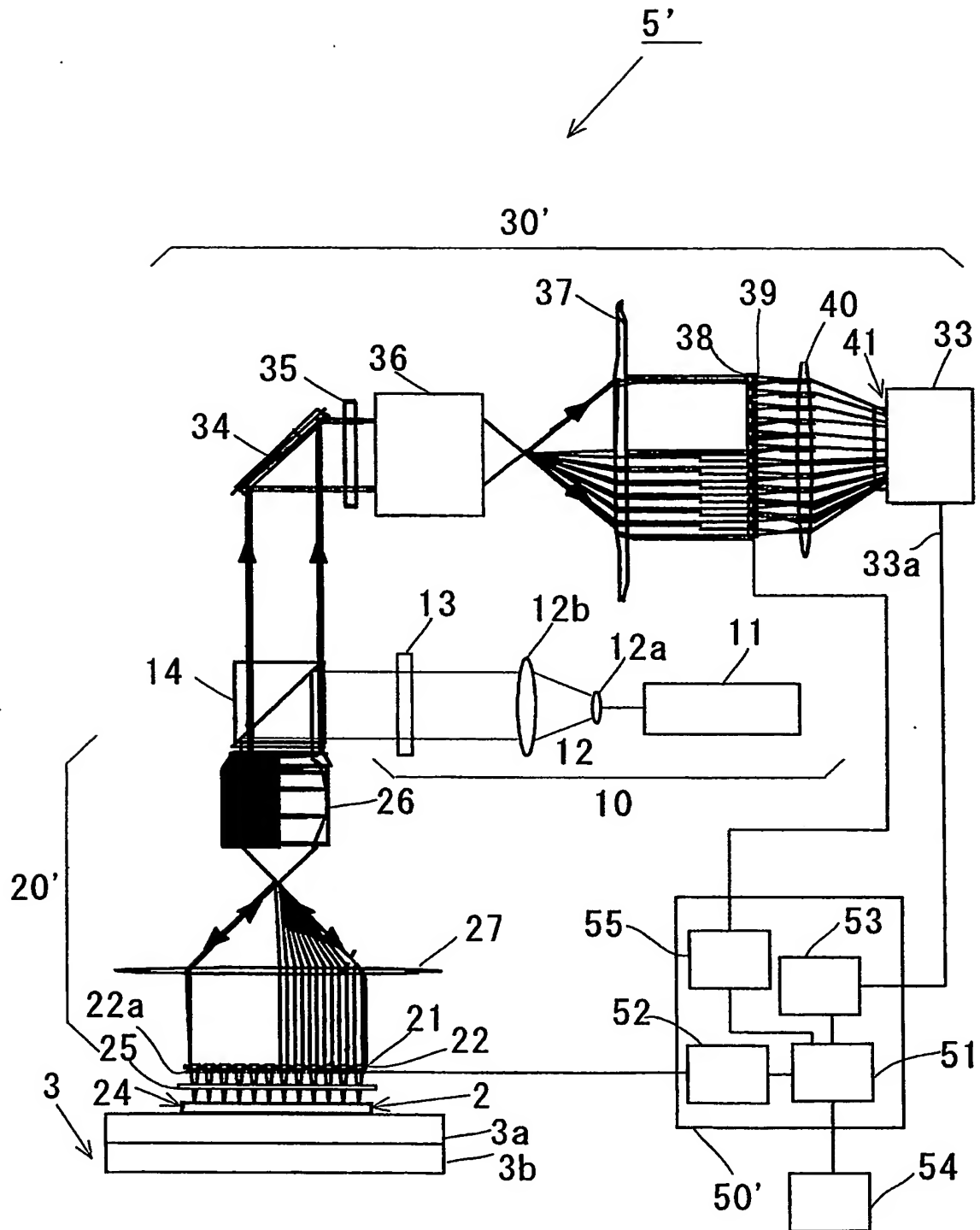
【図 5】



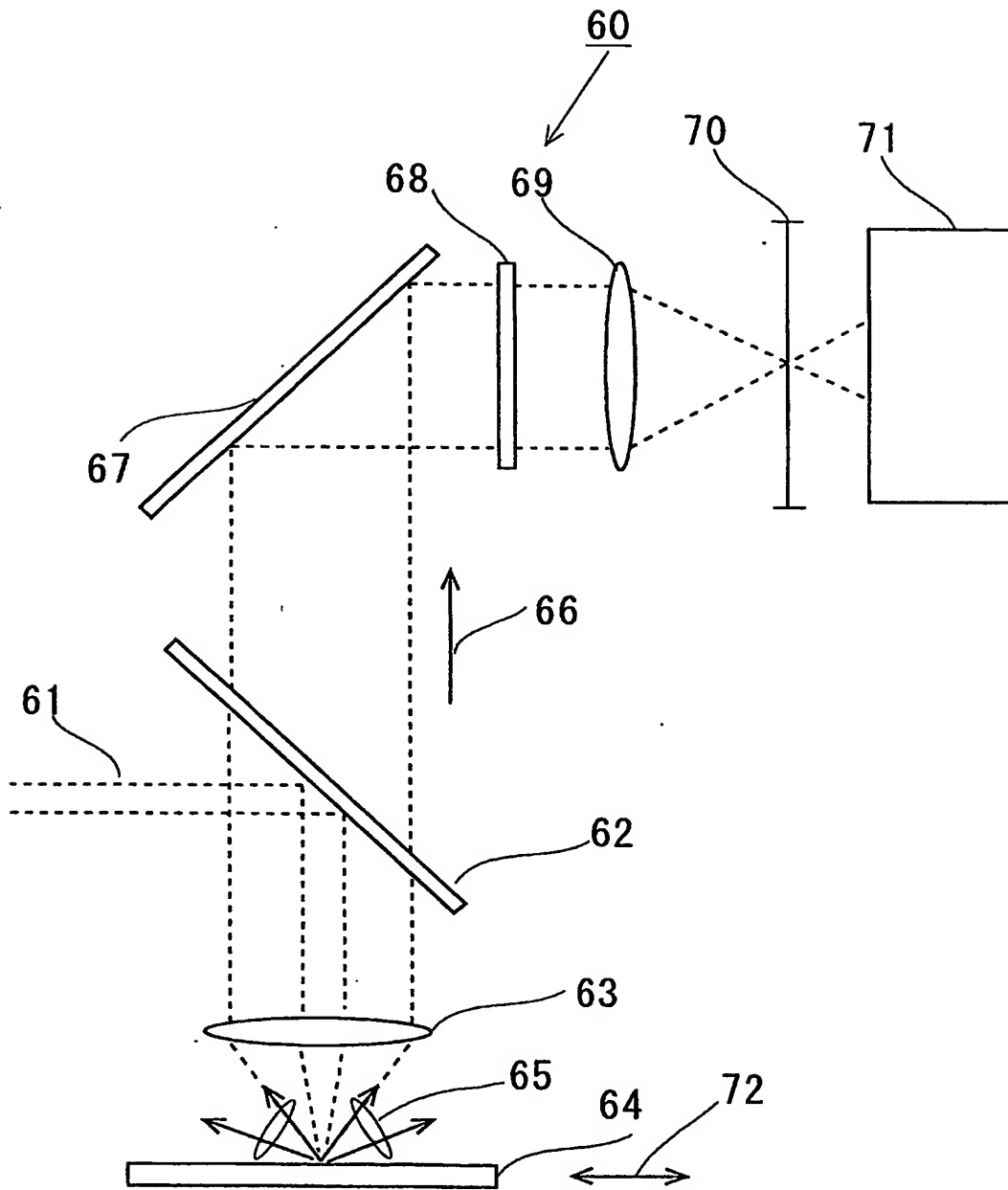
【図 6】



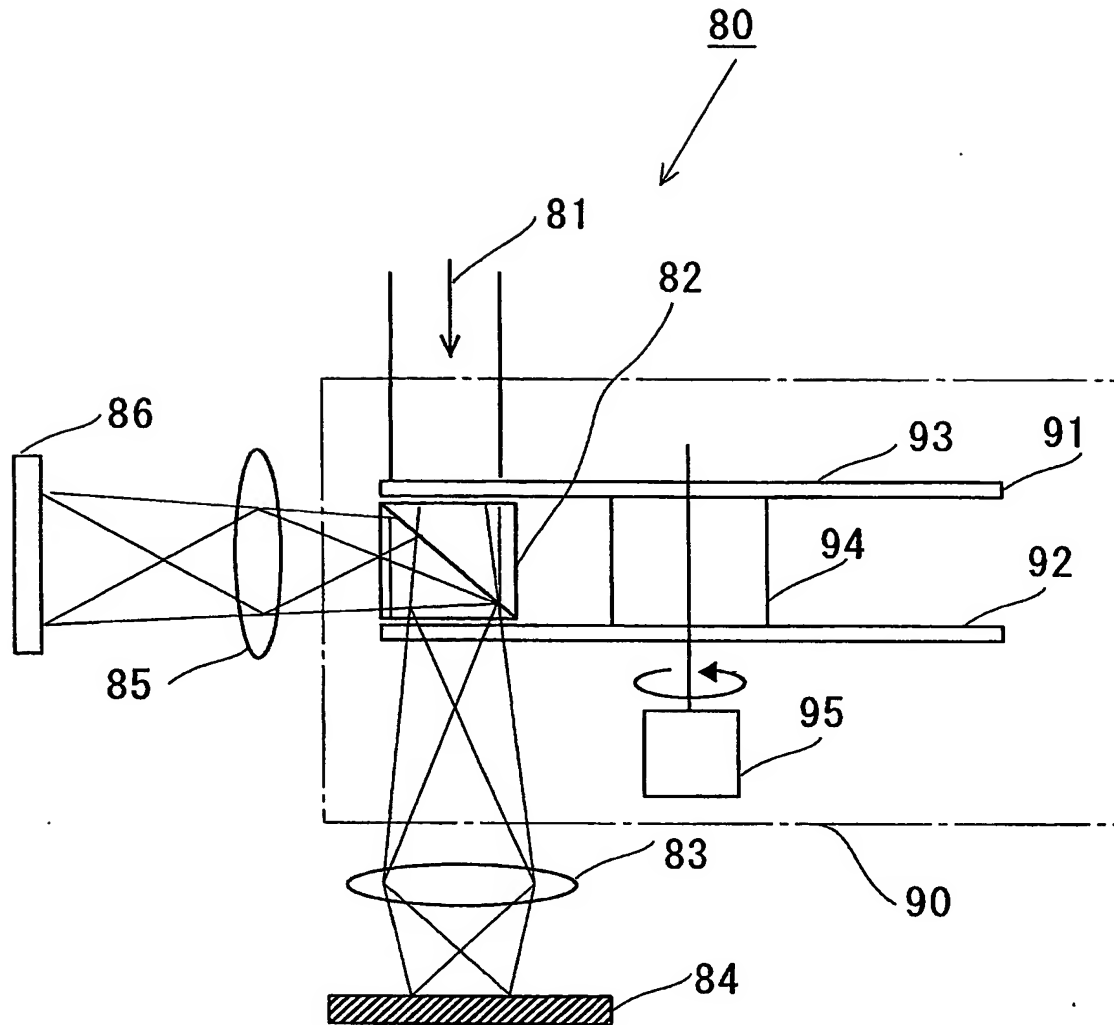
【図 7】



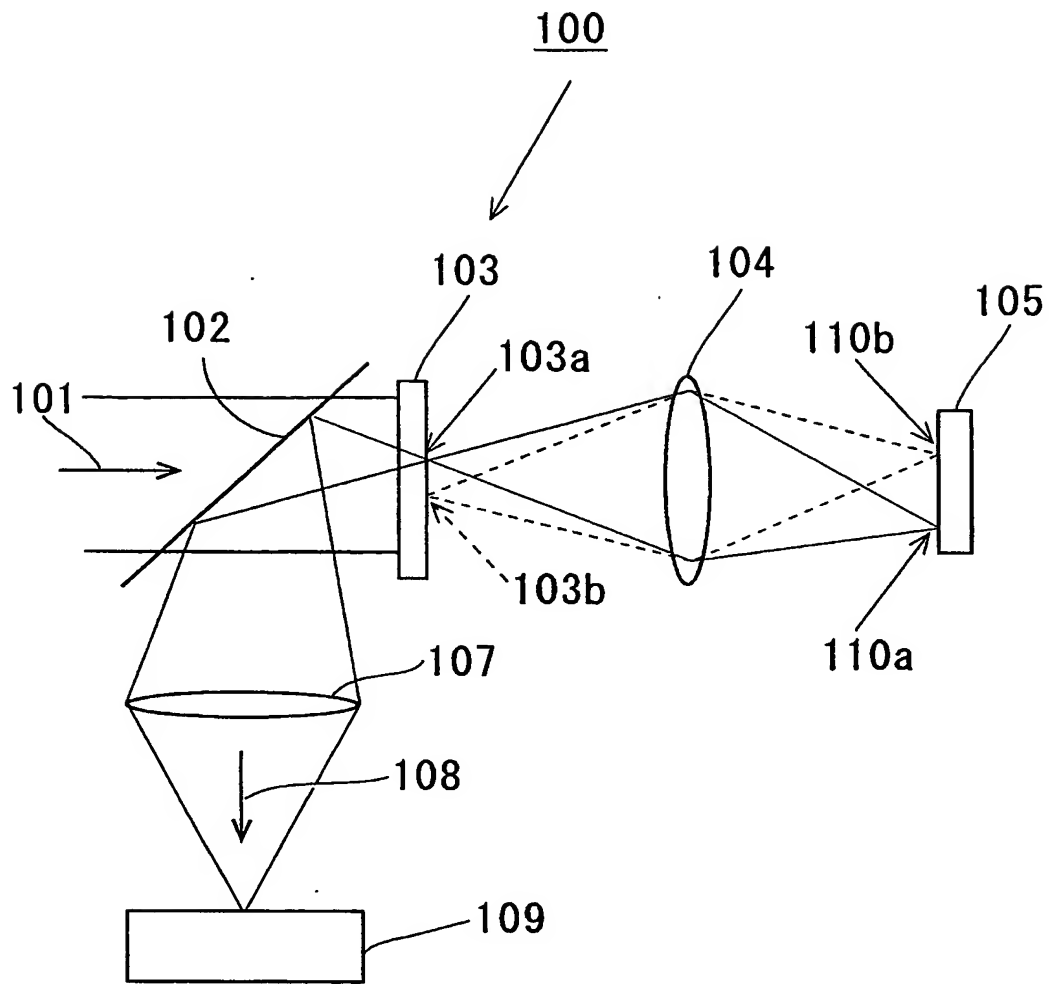
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生体組織や生体組織からの蛍光観察などに有効で、横方向、深さ方向の分解能に優れると共に、広領域の動的な観察が可能で機械的な走査が不要な、液晶を用いた共焦点顕微鏡及びこの共焦点顕微鏡によるマイクロアレイ基板からの蛍光測定方法を提供する。

【解決手段】 照明光源 11 から偏光を、マイクロレンズアレイ 21 を上部に配置したマトリクス式液晶素子 22 及び対物レンズ 23 を介して被観察物 2 へ入射する入射光学系 10 と、被観察物からの反射光又は蛍光を検出する検出光学系 30 と、液晶素子 22 を制御する液晶制御部 52 とを備え、マイクロレンズアレイ 21 を透過したマイクロレンズ毎の光を、液晶素子 22 の各画素 22a 毎に透過させ、対物レンズ 23 にて被観察物 2 に複数の焦点 24 を結ぶと共に、液晶素子 22 の各画素を透過する光の偏光方向を液晶制御部 52 を用いて制御する。

【選択図】 図 1

特願 2002-287422

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団